

INHIBITEURS DE L'ANGIOGENESE, COMPOSITIONS LES
CONTENANT ET LEUR UTILISATION POUR LE TRAITEMENT DES
MALADIES LIEES A UNE DEREGULATION DE L'ANGIOGENESE.

5 La présente invention se rapporte au domaine du traitement des maladies liées à une dérégulation de l'angiogenèse telles que les cancers, l'artériosclérose et le diabète. L'invention concerne des inhibiteurs de l'angiogenèse particuliers capables d'interférer avec les 10 différentes interactions de TAL-1 susceptibles d'être conjugués à des vecteurs tels que des peptides, des particules (liposomes, nanoparticules, etc.) et des polymères. L'invention concerne également une composition pharmaceutique contenant de tels inhibiteurs et leur utilisation pour le traitement de maladies liées à 15 l'angiogenèse, tout particulièrement pour le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

20 L'angiogenèse, processus de remodelage des capillaires préexistants, conduit à la formation de nouveaux vaisseaux [Riseau, Nature 386 ; 671 (1997)]. Dans des conditions physiologiques, l'angiogenèse est étroitement régulée sous le contrôle d'une balance locale entre facteurs stimulateurs (angiogéniques) et inhibiteurs 25 (angiostatiques). Chez l'adulte, la plupart des cellules de l'endothélium (plus de 99 %) sont à l'état quiescent. En réponse à un signal angiogénique, les cellules endothéliales (CEs) sortent de leur dormance et deviennent "activées" pour enclencher un programme d'angiogenèse. Ce 30 processus complexe inclut le mouvement des CEs pour sortir des capillaires et leur migration vers le site angiogénique, leur prolifération et leur différenciation pour former de nouveaux capillaires.

35 Une dérégulation de l'angiogenèse est observée dans certaines pathologies comme l'artériosclérose, le diabète

et les tumeurs [Carmeliet, Nat Med 6 ; 389 (2000)]. Quand les tumeurs atteignent une taille critique créant des conditions d'hypoxie, les cellules tumorales relarguent des cytokines, telles que VEGF ou bFGF, connues pour initier ou stimuler l'angiogenèse. L'angiogenèse, requise pour la croissance des tumeurs, est également un facteur majeur de propagation des cellules malignes dans l'organisme (métastases).

En dépit de progrès indéniables dans la lutte contre certains cancers, force est de reconnaître que globalement les cancers progressent et qu'ils constituent une cause majeure de mortalité. La découverte de nouveaux médicaments constitue une des priorités de la recherche médicale. Les progrès récents des connaissances scientifiques sur l'angiogenèse tumorale permettent de croire que le traitement fondé sur l'anti-angiogenèse offrirait une nouvelle modalité pour maîtriser la croissance tumorale chez les patients atteints de cancer.

Plusieurs stratégies anti-angiogéniques ont été développées pour inhiber la fonction de facteurs activateurs (VEGF ou bFGF), notamment avec des anticorps neutralisants dirigés contre la cytokine ou contre son récepteur. D'autres molécules anti-angiogéniques ont été dérivées d'inhibiteurs physiologiques présents dans le système hémostatique, comme le plasminogène (angiotensine), le collagène (endostatine) ou encore le fibrinogène (alphastatine) ; ces molécules inhibent l'adhésion des CEs à la matrice extracellulaire requise pour leur morphogenèse.

Une autre stratégie très peu explorée à ce jour est de cibler directement les évènements intracellulaires de la cellule endothéliale en réponse à des stimuli angiogéniques. Ainsi, la Demanderesse a montré que TAL-1, facteur de transcription de la famille basic-Helix-Loop-Helix (bHLH), module spécifiquement la réponse angiogénique

des cellules endothéliales : il contrôle leurs propriétés de migration et stimule leur différenciation en capillaires [Lazrak et al., J Cell Sci sous presse (2004)]. Les expériences de recombinaison homologue chez la souris ont démontré que le gène *tal-1* est requis pour certaines étapes du développement hématopoïétique et vasculaire. Les embryons *tal-1-/-* (n'exprimant pas *tal-1*) présentent une angiogenèse défective dans le sac vitellin qui semble refléter un défaut intrinsèque des cellules endothéliales [Visvader et al., Genes Dev 12 ; 473 (1998)]. Chez l'adulte, en dehors de certains progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, la protéine TAL-1 est exprimée dans les petits vaisseaux en formation, mais pas dans l'endothélium mature quiescent [Kallianpur et al., Blood 83 ; 1200 (1994)]; de manière significative, un haut niveau d'expression de TAL-1 est observé dans la vasculature de tumeurs humaines [Chetty et al., J Pathol 181 ; 311 (1997)]. TAL-1 constitue donc un marqueur des CEs angiogéniques. De ce fait, nous avons ciblé TAL-1 pour inhiber l'angiogenèse.

La Demanderesse a développé de nouvelles molécules capables de bloquer spécifiquement l'activité de TAL-1 dans les cellules endothéliales. Le motif HLH de TAL-1 est requis pour toutes les activités du facteur TAL-1 connues à ce jour : fixation à l'ADN ou interaction avec d'autres facteurs nucléaires notamment E47 ou LMO 2 [Hsu et al., Proc. Natl. Acad. Sci 91 ; 3181 (1994) ; Vitelli et al., Mol Cell Biol 20 ; 5330 (2000)](Figure 1). La Demanderesse a développé des inhibiteurs peptidiques capables d'entrer en compétition avec le domaine HLH de TAL-1. Ces inhibiteurs peptidiques ont été ensuite couplés à des vecteurs peptidiques pour permettre et/ou améliorer leur internalisation dans les cellules.

Les travaux et résultats concernant ces peptides vecteurs et leur utilisation comme vecteurs pour transporter des molécules actives ont été décrits dans la demande de brevet français N° 97/10297 déposée le 08
5 décembre 1997.

Dans les séquences peptidiques rapportées ci-après,
les acides aminés sont représentés par leur code à une
lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur
10 code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

A	Ala	alanine	
C	Cys	cystéine	
D	Asp	acide aspartique	
E	Glu	acide glutamique	
15	F	Phénylalanine	
G	Gly	glycine	
H	His	histidine	
I	Ile	isoleucine	
K	Lys	lysine	
20	L	Leu	leucine
M	Met	méthionine	
N	Asn	asparagine	
P	Pro	proline	
Q	Gln	glutamine	
25	R	Arg	arginine
S	Ser	sérine	
T	Thr	thréonine	
V	Val	valine	
W	Trp	tryptophane	
30	Y	Tyr	tyrosine

La présente invention a donc pour objet un inhibiteur peptidique (également appelé molécule peptidique) capable d'interférer avec le domaine HLH de TAL-1, constitué par ou comprenant au moins 10 acides aminés successifs et, de préférence, au moins 15 acides aminés successifs du domaine HLH de TAL-1 de séquence :

QQNVNGAFAELRKLIPTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA

correspondant à la SEQ ID No. 1 dans le listage de séquences en annexe ou une séquence équivalente.

10

Par « séquence équivalente », on entend la séquence d'un variant connu du domaine HLH de TAL-1 mais aussi une séquence présentant un ou plusieurs substitutions, délétions et/ou additions d'acides aminés par rapport à la séquence SEQ ID No. 1, lesdites substitutions, délétions et/ou additions d'acides aminés ne modifiant pas les activités du facteur TAL-1 ainsi obtenu comme sa fixation à l'ADN ou son interaction avec d'autres facteurs nucléaires notamment E47 ou LMO 2. L'homme du métier connaît différentes techniques pour vérifier les activités du facteur de transcription TAL-1 ainsi obtenu. De plus, dans le cadre de la présente invention, on entend par « séquence équivalente », des peptides qui présentent une modification post-traductionnelle et/ou une modification chimique en particulier une glycosylation, une amidation, une acylation, une acétylation, une méthylation ainsi que les peptides qui portent un groupement protecteur. Les dérivés des peptides de l'invention peuvent également être ceux dont un ou plusieurs acides aminés sont des énantiomères, des diastéréoisomères, des acides aminés naturels de conformation D, des acides aminés rares notamment l'hydroxyproline, l'hydroxylysine, l'allo-hydroxylysine, la 6-N-méthyllysine, la N-éthylglycine, la N-méthylglycine, la N-éthylasparagine, l'allo-isoleucine, la N-méthylisoleucine, la N-méthylvaline, la pyroglutamine,

35

l'acide aminobutyrique et les acides aminés synthétiques notamment l'ornithine, la norleucine, la norvaline, la cyclohexyl-alanine et les oméga-acides aminés. Les dérivés couvrent également les rétropeptides et les rétro-inversopeptides, de même que les peptides dont la chaîne latérale d'un ou plusieurs des acides aminés est substituée par des groupements qui ne modifient pas l'activité antimicrobienne des peptides de l'invention.

Par « molécule peptidique », on entend dans le cadre de la présente invention une molécule constituée par ou qui comprend au moins une séquence peptidique, ladite molécule pouvant comprendre en outre des entités chimiques additionnelles autres que des acides aminés.

De préférence, l'inhibiteur ou molécule peptidique objet de la présente invention est choisi parmi le composé 1 de séquence : QQNVNGAFAELRKLIPTHPPDKKLSNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe), le composé 2 de séquence : VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFAELRKLI (SEQ ID No. 2 dans la liste de séquences en annexe) et le composé 3 de séquence : PTHPPDKKLSNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 3 dans la liste de séquences en annexe) ou une séquence équivalente auxdites séquences. Ainsi, l'inhibiteur de la présente invention est constitué par ou comprend une séquence choisie parmi les séquences suivantes :

- QQNVNGAFAELRKLIPTHPPDKKLSNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe),
 - VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFAELRKLI (SEQ ID No. 2 dans la liste de séquences en annexe) et
 - PTHPPDKKLSNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 3 dans la liste de séquences en annexe)
- ou une séquence équivalente auxdites séquences.

Dans une forme de mise en œuvre préférée, l'inhibiteur ou molécule peptidique objet de la présente

invention est associé à un vecteur. De façon avantageuse, ce vecteur est capable d'augmenter le transport dudit inhibiteur dans les cellules et organes cibles.

L'homme du métier connaît différents types de vecteurs peptidiques utilisables dans le cadre de la présente invention. Ainsi, à titre d'exemples et de façon non-limitative, le vecteur est choisi, parmi le groupe comprenant :

- un peptide linéaire dérivé de protégrines ou de tachyplésines [brevet français N° 97/10297],

- un peptide linéaire comprenant un domaine de transduction tels que les domaines de transduction de la protéine Tat de HIV-1 [Fawell et al., Proc. Natl. Acad. Sci 91 ; 664 (1994) ; Schwarze et al., Science 285 ; 1569 (1999)] et les domaines de transduction dérivés de la troisième hélice d'Antennapedia [Derossi et al., J. Biol. Chem 269, 10444 (1994) ; Brevet US 5888762].

- des particules comme les liposomes [Dass and Su. (2001) Drug Deliv. 8:191-213] ou des nanoparticules [Panyam and Labhasetwar (2003) Adv Drug Deliv Rev. 55:329-47 ; Douglas et al. (1987) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 3:233-61],

- des polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG) [Greenwald et al. (2003) Adv Drug Deliv Rev. 55:217-50].

L'invention envisage tout particulièrement comme peptide linéaire dérivé de Protégrines, un peptide qui répond à la formule (I) suivante :

BX(X ou B)BXXXXBBBXXXXXXB (I)

et comme peptide linéaire dérivé de Tachyplésines, un peptide qui répond à la formule (II) suivante :

(B ou X)XXXBXXXBXXXXBBXB (II),

dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

5 - les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique

ou un fragment de ceux-ci constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés
10 successifs des peptides de formules (I) ou (II).

La présente invention concerne également l'utilisation d'un vecteur tel que défini précédemment pour vectoriser dans les cellules, les tissus et/ou les organes un inhibiteur peptidique tel que défini précédemment.

15

La liaison entre l'inhibiteur ou molécule peptidique de Tal-1 capable d'interférer avec les différentes interactions de TAL-1 tel que précédemment défini et du vecteur est choisie parmi une liaison covalente, une liaison hydrophobe, une liaison ionique, une liaison clivable ou une liaison non clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur des cellules.

20

Cette liaison peut être directe ou indirecte par l'intermédiaire d'un bras de liaison (linker) et effectuée au moyen d'un groupe fonctionnel naturellement présent ou introduit soit sur le vecteur, soit sur l'inhibiteur, soit sur les deux. Ce bras de liaison, s'il est présent, doit être acceptable compte tenu de la nature chimique et de l'encombrement tant du vecteur que de l'inhibiteur. On peut citer, à titre d'exemple et de façon non-limitative, des linkers contenant des groupements alkyle, aryle, aralkyle ou peptidique, des esters, aldéhydes ou acides d'alkyle, aryle ou aralkyle, des groupements anhydrides, sulfhydriles, ou carboxyles tels que les dérivés de l'acide maleymil benzoïque, de l'acide maleymil propionique et des

25

dérivés succynimidyle, des groupes dérivés du bromure ou chlorure de cyanogène, carbonyldiimidazole, des esters de succinimide ou des halogénures sulphoniques.

Comme groupes fonctionnels, on peut citer : -OH, -SH, -COOH, ou -NH₂. Ainsi, l'inhibiteur peut être lié par des liaisons covalentes au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des chaînes latérales du peptide vecteur.

Un type de liaison préféré entre l'inhibiteur de l'angiogenèse et le vecteur implique au moins un pont dissulfure.

De façon particulièrement avantageuse, l'inhibiteur de la présente invention est choisi parmi les deux composés suivants :

- composé 4 :



- composé 5 :



20

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un inhibiteur (ou molécule) peptidique tel que défini précédemment, avantageusement associé dans ladite composition à un véhicule acceptable.

25

De préférence, ladite composition pharmaceutique se présente sous une forme appropriée pour une administration par voie parentérale, par voie orale, par voie rectale, par voie nasale, par voie transdermique, par voie pulmonaire ou par voie centrale. Par « véhicule », on entend selon la présente invention, toute substance qui est ajoutée à

l'inhibiteur de l'invention pour favoriser son transport, éviter sa dégradation substantielle dans ladite composition et préserver ses propriétés inhibitrices. Le véhicule est choisi en fonction du type d'application listé ci-dessus de la composition.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de traitement des maladies liées à une dérégulation de l'angiogenèse comme les cancers, l'artériosclérose et le diabète, consistant à administrer à un sujet souffrant d'une telle maladie une quantité efficace d'un inhibiteur ou d'une composition tels que décrits précédemment.

L'invention concerne encore l'utilisation d'un inhibiteur ou d'une composition tels que décrits précédemment pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies liées à l'angiogenèse, et plus particulièrement des maladies liées à une dérégulation de l'angiogenèse, et de préférence au traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

L'invention concerne également l'utilisation d'un composé capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, au traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

Dans une première forme de mise en œuvre de la présente invention, un composé capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 est un inhibiteur compétitif du domaine HLH de TAL-1. De façon préférée, un tel composé est une molécule peptidique telle que précédemment définie.

Dans une deuxième forme de mise en œuvre de la présente invention, un composé capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 est un composé capable d'inhiber la fixation de TAL-1 sur son partenaire E47. De façon préférée, un tel composé est un anticorps reconnaissant soit un épitope au niveau du domaine HLH de TAL-1, soit un épitope au niveau du domaine HLH de E47.

Les applications et utilisations envisagées pour les inhibiteurs (inhibiteurs ou molécules peptidiques) précédemment décrites s'appliquent mutatis mutandis aux composés capables d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 (méthodes de traitement, compositions pharmaceutiques, etc...).

15

Enfin, la présente invention concerne un procédé pour identifier un composé biologiquement actif susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète consistant à détecter l'inhibition de l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 en présence dudit composé.

25

Par "composé biologiquement actif", la présente invention concerne plus particulièrement tout composé chimique naturel ou synthétique tels que, à titre d'exemples et de façon non exhaustive, des protéines, des polypeptides, des peptides, des aptamères, des lipoprotéines, des polysaccharides, de petites molécules, des molécules non-peptidiques, etc.... Après l'identification dudit composé biologiquement actif, il sera facile tester son activité dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le

traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète par des méthodes bien connues de l'homme du métier.

5 L'homme du métier a à sa disposition différentes techniques lui permettant de vérifier si le composé biologiquement actif à tester est capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47.

10 Dans une première forme de mise en œuvre, la méthode de l'invention comprend les étapes suivantes :

15 (a) mettre en contact la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) et le composé biologiquement actif à tester,

20 (b) immunoprécipiter soit la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), soit le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1),

25 (c) si, à l'étape (b), la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) est immunoprécipitée, détecter dans le immunoprécipitat obtenu à l'étape (b), la présence du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1),

30 (d) si, à l'étape (b), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) est immunoprécipité, détecter dans l'immunoprécipitat obtenu à l'étape (b), la présence de la protéine TAL-1 (ou d'un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH),

35 dans le cas où le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) n'est pas présent à l'étape (c) ou si la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant

le domaine HLH) n'est pas présente à l'étape (d), ledit composé est un agent susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

L'homme du métier a à sa disposition différentes protéines susceptibles d'être mises en œuvre dans le cadre de la méthode de l'invention. A titre d'exemples, la protéine E47 utilisable peut être la protéine de *Gallus gallus* présente dans Genbank sous le numéro CAE30454 ou la protéine de *Mus musculus* présente dans Genbank sous le numéro AAK18618. De la même façon, la protéine TAL-1 utilisable est la protéine de *Homo sapiens* présente dans Genbank sous le numéro P17542 ou la protéine de *Mus musculus* présente dans Genbank sous le numéro P22091. L'homme du métier connaît dans ces séquences les domaines particulièrement intéressants dans le cadre de la présente invention.

A l'étape (b) de la méthode objet de la présente invention, l'homme du métier saura quel type d'anticorps utilisé en fonction de la protéine à immunoprécipiter (anticorps spécifique du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) ou anticorps spécifique de la protéine TAL-1 (ou d'un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH)).

La détection, à l'étape (c), de la présence, dans l'immunoprécipitat obtenu à l'étape (b), du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) peut être réalisée par toute technique de l'homme du métier comme, par exemple, un Western Blot utilisant un anticorps spécifique du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit

avec TAL-1), un dosage de l'activité du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) ou une méthode mettant en œuvre un facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) marqué, ledit marquage pouvant être un marquage radioactif.

La même mise en œuvre peut être réalisée *mutatis mutandis* pour la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) à l'étape (d).

Dans une seconde forme de mise en œuvre, la méthode comprend les étapes suivantes :

(a') mettre en contact la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) et le composé biologiquement actif à tester,

(b') faire migrer sur un gel de polyacrylamide non dénaturant le mélange obtenu à l'étape (a'),

(c') visualiser l'absence ou la présence du complexe TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) et E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1).

L'absence de ce complexe à l'étape (c') met en évidence l'action inhibitrice du composé actif testé et donc que ce composé est un agent susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

A l'étape (c') de la méthode objet de l'invention, différentes techniques connues de l'homme du métier peuvent être mises en œuvre. A titre d'exemples, on peut réaliser un Western blot utilisant des anticorps spécifiques de

l'une ou l'autre des protéines TAL-1 ou E47 ou de leurs fragments.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent concernant la préparation d'un composé constitué d'un inhibiteur de TAL-1 et d'un peptide vecteur ainsi que sur leurs effets *in vitro* et *in vivo*. Il sera fait référence aux dessins en annexe dans lesquels :

- la figure 1 représente schématiquement la représentation du dimère HLH.
- la figure 2 illustre l'inhibition de l'interaction de TAL-1 et E47 *in vitro* par les différents inhibiteurs.
- la figure 3 illustre l'inhibition de l'interaction de TAL-1 et E47 *in vitro* par l'inhibiteur couplé à un peptide vecteur,
- la figure 4 illustre l'effet des composés sur la survie des cellules endothéliales HUVEC,
- la figure 5 illustre l'effet d'un des composés de l'invention sur la tubulogenèse *in vitro* des cellules endothéliales humaines après 22 heures de culture,
- la figure 6 présente l'effet des composés de l'invention sur l'angiogenèse *in vivo* chez la souris par analyse macroscopique des implants de Matrigel complémentés ou non par des composés de l'invention,
- la figure 7 présente l'effet des composés de l'invention sur l'angiogenèse *in vivo* chez la souris par dosage de l'hémoglobine contenue dans lesdits implants de Matrigel.

30

I - Synthèse Chimique.

1) Synthèse des inhibiteurs de TAL-1 libres et vectorisés.

Les peptides ont été assemblés sur phase solide selon une stratégie Foc/tu, clivés et déprotégés par l'acide

35

trifluoroacétique, puis purifiés par chromatographie haute pression préparative en phase inverse et lyophilisés. leur pureté (>95%) et leur identité ont été confirmées par HPLC analytique et par spectrométrie de masse. Séquence des peptides : SynB3 (H-RRLSYSRRRF-NH₂ ; 1394.8 Da, SEQ ID No. 5 dans la liste de séquences en annexe), SynB4 (H-AWSFRVSYRGISYRRSR-NH₂ ; 2145,1 Da, SEQ ID No. 6 dans la liste de séquences en annexe), Tal-HLH (H-QQNVNGAFAELRKLIPTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA-NH₂, SEQ ID No. 10 dans la liste de séquences en annexe)

2) Couplage des inhibiteurs sur les peptides vecteurs.

Activation des vecteurs : Les peptides vecteurs SynB3 et SynB4 ont été traités par SPDP (N-Succinimidyl 3-(2-Pyridylthio)propionate) dans Dimethylformamide (DMF) en présence de DIEA (Diisopropylethylamine). Les peptides résultants (2-Pyridylthio)propionyl-SynB3 (1591.8 Da) et (2-Pyridylthio)propionyl-SynB4 (2342.1 Da) ont été purifiés par HPLC et lyophilisés.

Préparation des conjugués : Chaque peptide vecteur activé (2-Pyridylthio)propionyl-SynBx (1eq) a été solubilisé avec C-TalHLH (1eq) dans DMF, en présence de DIEA de façon à former un pont dissulfure entre la chaîne latérale de la Cystéine de C-TalHLH (composé Tal-HLH synthétisé avec une cystéine en plus) et le 3-Mercapto-propionate porté par le vecteur. Les conjugués résultants (Tal-HLH-SynB3 ; 6303 Da et Tal-HLH-SynB4 ; 7052.6 Da) ont été précipités par addition d'éther, puis purifiés par HPLC et lyophilisés. Le contrôle de qualité par HPLC analytique à 220 nm et par spectrométrie de masse MALDI-TOF a confirmé les masses molaires et a déterminé une pureté supérieure à 96%.

II - Composés testés.

Les composés testés sont présentés dans le tableau 1 ci-après.

Tableau 1

Composé	Nom	Séquence
1	Tal-HLH	QQNVNGAFAELRKLIPTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe)
2	Tal-hel 1rb	VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFAELRKLI (SEQ ID No. 2 dans la liste de séquences en annexe)
3	Tal-hel 2b	PTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 3 dans la liste de séquences en annexe)
4	TalHLH-SynB4	 (SEQ ID No. 4 dans la liste de séquences en annexe)
5	TalHLH-SynB3	 (SEQ ID No. 5 dans la liste de séquence en annexe)
6	SynB4	AWSFRVSYRGISYRRSR (SEQ ID No. 6 dans la liste de séquence en annexe)
7	SynB3	RRLSYSRRRF (SEQ ID No. 7 dans la liste de séquence en annexe)

5

1) Test de traduction/immunoprécipitation.

Les deux protéines TAL-1 et E47 sont co-traduites *in vitro* en utilisant des plasmides permettant la transcription et la traduction des séquences codantes dans le système TNT-T7-coupled Reticulocyte Lysate, selon les conditions proposées par le fournisseur (Promega). La traduction est réalisée en présence de méthionine S³⁵, avec addition ou non de peptides dissous dans une solution d'urée 2M. Une aliquote (1 µl) de chaque traduction est contrôlée par électrophorèse et autoradiographie du gel ; l'addition de peptide jusqu'à 0.7 µg dans le lysat de

5

réticulocyte (volume final 25 µl) n'affecte pas l'efficacité de la traduction des deux protéines.

Après une incubation de 30 min à 37°C, les produits de traduction sont immunoprécipités par un mélange d'anticorps monoclonaux anti-TAL-1 (BTL 73 + 2TL 136 ; [Pulford et al., Blood 85 ; 675 (1995)]) puis analysés par électrophorèse et autoradiographie du gel. On quantifie l'interaction TAL-1-E47 pour chaque point en calculant le ratio E47/TAL-1 obtenu d'après le scan de l'autoradiographie ; l'intensité de la bande correspondant à TAL-1 sert ici de normalisation dans tous les puits. L'interaction en absence de peptide est arbitrairement établie à 100 %.

15 2) Test de cytotoxicité.

Les cellules hématopoïétiques K562 ont été obtenues commercialement auprès de l'ATCC. Les cellules sont ensemencées à environ 10⁴ cellules par puits, 24 h avant l'addition des produits. Elles sont alors à 60-80% de confluence le jour de l'expérience. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère à 95% d'humidité et 5% de CO₂, dans un milieu OptiMem®.

Les cellules sont incubées soit avec les composés à des concentrations croissantes pendant 48 heures. A la fin du temps de culture, le MTT (3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromure) est rajouté dans les puits et les plaques de culture sont ensuite incubées pendant 4 heures dans l'étuve. Le dépôt cristallin de formazan résultant est alors dissous par addition de 200 µl de DMF/SDS. La densité optique (DO) est mesurée à 550 nm (référence 630 nm) en utilisant un lecteur de microplaques.

La représentation graphique des pourcentages de DO des puits traités en fonction de la concentration de produits permet de déterminer la DL₅₀. Celle-ci correspond

à la concentration du produit inhibant 50% de la croissance.

3) Test de survie des cellules endothéliales.

5 Les cellules endothéliales humaines dérivées de la veine du cordon ombilical, HUVEC, (Clonetics) sont cultivées sur boîtes coatées avec de la gélatine dans du milieu EBM-2 complet (Clonetics) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté. Les cellules sont
10 utilisées entre les passages 3 et 5. Les cellules ECV 304 (obtenues auprès de l'ATCC) sont cultivées en DMEM avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté.

15 Les cellules sont décollées à la trypsine et suspendues dans un milieu sans sérum (OptiMEM, Invitrogen). Environ 8 10³ cellules dans 200 µl sont incubées pendant 20 min en présence de différentes concentrations de peptides, centrifugées, puis ensemencées en milieu EBM2 complet dans des puits (plaqué 48 puits) coatés avec du collagène I. Après 24 heures dans l'étuve, la survie cellulaire est estimée par un test MTT, réalisé selon les recommandations
20 du fournisseur (Sigma).

III - Résultats.

1) Effet des peptides inhibiteurs sur l'interaction de TAL-1/E47 *in vitro*.

15 Nous avons choisi de tester si les composés décrits dans le Tableau 1 (Composés 1, 2 et 3) pouvaient affecter la formation des hétéro dimères TAL-1-E47, médiée par le domaine HLH des deux protéines. Le composé 1 contient tout le domaine HLH de TAL-1 soit l'hélice 1- boucle-hélice 2 ; le composé 2 comprend la région basique et l'hélice 1 ; le composé 3 contient la boucle et l'hélice 2 (voir figure 1).

20 Nous avons utilisé un test de co-immunoprecipitation de TAL-1 et E47 traduites *in vitro* par des anticorps dirigés contre l'une des protéines.

Nos expériences montrent que le composé Tal-HLH entier (composé 1) inhibe efficacement l'interaction de TAL-1 avec E47 et de façon dose-dépendante (50 à 60% d'inhibition avec 0.2 µg ; 90 à 100% avec 0.5 µg) (Figure 2 A et B). Les deux autres peptides inhibiteurs (composés 2 et 3) ont un plus faible pouvoir inhibiteur ne dépassant pas 50% dans les plus fortes concentrations (Figure 2A). Nous avons donc choisi d'utiliser le peptide inhibiteur Tal-HLH (composé 1) pour la suite des expériences.

10

2) Effet des peptides inhibiteurs couplés avec des peptides vecteurs sur l'interaction de TAL-1/E47 *in vitro*.

15

Nous avons voulu savoir si la vectorisation ou le couplage du peptide inhibiteur Tal-HLH ne modifiait pas son effet inhibiteur sur l'interaction de TAL-1 *in vitro* avec E47. L'inhibiteur a été couplé à deux peptides vecteurs (SynB3 et SynB4) via une liaison dissulfure (composés 5 et 4, respectivement). Ces deux peptides vecteurs ont la propriété d'augmenter le transport des molécules à travers les membranes cellulaires. Les résultats présentés dans la figure 3 confirment que la vectorisation du peptide inhibiteur Tal-HLH ne modifie pas son effet inhibiteur. De manière intéressante, l'inhibiteur couplé au vecteur SynB3 (composé 5) s'est révélé plus actif que l'inhibiteur Tal-HLH (composé 1).

20
25
30
35

3) Effet des peptides inhibiteurs couplés sur les cellules hématopoïétiques.

Dans un premier temps, l'effet de l'inhibiteur vectorisé a été étudié sur une lignée hématopoïétique (K562) dont la survie requiert l'activité de TAL-1. La lignée hématopoïétique T (H9) a été utilisée comme contrôle car sa croissance est indépendante de TAL-1. Ces deux lignées leucémiques peuvent survivre plusieurs jours en l'absence de facteurs de croissance, ce qui permet de

tester l'effet des peptides dans un milieu dépourvu de sérum.

Comme attendu, aucune différence significative n'a été observée dans les cellules H9 (TAL-1 négative), selon que le peptide Tal-HLH est vectorisé ou non (résultats non montrés). Par contre, le peptide Tal-HLH a un effet cytotoxique plus élevé sur les cellules K562 (nécessitant l'activité de TAL-1) lorsqu'il est vectorisé (Tableau 2). En effet la DL50, qui correspond à la concentration du produit inhibant 50% de la croissance, est deux fois plus faible pour l'inhibiteur vectorisé (composé 4) que pour l'inhibiteur seul (composé 1).

Tableau 2

Composé	nom	DL 50 (μ M)
Composé 1	Tal-HLH	11.5
Composé 4	TalHLH-SynB4	5.7
Composé 6	SynB4	12.3

Ces résultats constituent une première validation que le peptide Tal-HLH vectorisé (Composé 4) est capable d'inhiber spécifiquement l'activité de TAL-1 dans les cellules.

20 4) Effet des peptides inhibiteurs couplés sur la survie des cellules endothéliales.

Nous avons également étudié les effets de l'inhibiteur libre et vectorisé sur la survie des cellules endothéliales. La figure 4 montre que le composé 1 n'a aucun effet sur la survie des cellules HUVEC. Par contre, une fois couplé (composés 4 et 5) il affecte spécifiquement la survie des cellules HUVECs et de façon dose-dépendante. Le couplage du produit par un peptide vecteur était important pour avoir un effet sur la survie car l'addition simultanée de l'inhibiteur et du peptide vecteur non-

couplés n'avait aucun effet. Dans les cellules ECV 304, utilisées comme contrôle négatif, les composés ont induit une toxicité cellulaire non spécifique qu'ils soient couplés ou non-couplés (résultats non montrés).

5 Ces expériences démontrent l'effet spécifique de l'inhibiteur de TAL-1 lorsqu'il pénètre dans les cellules endothéliales grâce au vecteur peptidique.

10 5) Effet des peptides sur la tubulogenèse *in vitro* des cellules endothéliales humaines (gels de collagène en 3-D).

15 Les cellules endothéliales HUVEC ensemencées au sein d'un gel de collagène I concentré (1mg/ml) s'arrêtent de proliférer et, en présence de milieu d'activation (MDCB131, 1% sérum de veau fœtal, VEGF 2 ng/ml, bFGF 20 ng/ml et PMA 80 nM), elles s'organisent rapidement en cordons cellulaires pour constituer un réseau primitif ; dans les 24-48 hrs, les cellules alignées s'allongent, fusionnent entre elles et forment progressivement des pseudos tubules. 20 Nous avons testé les effets du peptide HLH vectorisé (composé 1) dans ce système de tubulogenèse *in vitro* de cellules endothéliales humaines issues de cordon ombilical (HUVECs). Des concentrations croissantes de peptide vectorisé (composé 5) ou de cargo seul (composé 1) ont été 25 ajoutées à la fois dans la solution de collagène contenant les cellules et dans le milieu d'activation.

30 La figure 5 illustre une de ces expériences : le peptide HLH vectorisé (composé 5) affecte très fortement la tubulogenèse entre 7 et 10 µM alors que le cargo seul (composé 1) n'a aucun effet dans cette gamme de concentration par rapport aux cultures contrôles (5% DMSO).

35 6) Effet des peptides sur l'angiogenèse *in vivo* chez la souris (Matrigel plugs).

Le test de Matrigel plugs consiste à injecter en sous-cutané chez la souris du Matrigel, matrice extracellulaire dérivée d'une tumeur murine, capable de déclencher une néovascularisation au sein de l'implant. En effet, les cellules endothéliales de l'hôte, sous l'influence des facteurs pro-angiogéniques contenues dans le Matrigel, migrent vers cette « pseudo-tumeur » et s'infiltrent dans le Matrigel pour organiser un réseau de capillaires entre 5 et 7 jours.

Dans les expériences décrites ci-dessous, deux injections sous-cutanées de Matrigel (500 µl) ont été effectuées de par et d'autre de la ligne médiane de l'abdomen. Juste avant l'injection, les souris ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Forène®).

Le Matrigel (BDBiosciences ; lot 10403, 13 mg/ml) a été complémenté par du bFGF (500 ng/ml), de l'héparine (60 U/ml) et les différents peptides SynB3 (composé 7), SynB3-HLH (composé 5), SynB4 (composé 6), SynB4-HLH (composé 4) sont ajoutés à une concentration finale de 20 µM en 5% DMSO.

Les souris ont été divisées en 3 groupes de six animaux identiques (mâles C57BL/6 âgés de 6 semaines).

- chaque souris du groupe témoin (souris 1 à 6) a reçu deux injections de Matrigel contenant 5% de DMSO du côté gauche et un peptide témoin anti-angiogénique du côté droit,

- chaque souris du groupe « SynB3 » (souris 7 à 12) a reçu deux injections de Matrigel contenant SynB3 du côté gauche et SynB3-HLH du côté droit,

- chaque souris du groupe « SynB4 » (souris 13 à 18) a reçu deux injections de Matrigel contenant SynB4 du côté gauche et SynB4-HLH du côté droit.

Six jours après l'injection, les souris ont été sacrifiées par inhalation de CO₂ et les implants ont été récupérés pour évaluer l'angiogenèse (photographie et dosage de l'hémoglobine). L'angiogenèse a été quantifiée par dosage de l'hémoglobine contenue dans les implants de Matrigel avec une solution de Drabkin selon les recommandations du vendeur (Sigma Chemical Co).

Les résultats présentés sur les figures 6 (analyse macroscopique) et 7 (dosage de l'hémoglobine), montrent que l'addition des peptides vecteurs seuls n'a pas d'effets significatifs sur l'angiogenèse ; par contre le peptide HLH conjugué avec l'un ou l'autre des vecteurs inhibe efficacement la néovascularisation dans les implants (11 sur 12). Cette inhibition était beaucoup plus importante que celle obtenue par un inhibiteur (Tum) connu pour inhiber l'angiogenèse.

REVENDICATIONS

1) Molécule peptidique capable d'interférer avec le domaine HLH de TAL-1, constituée par ou comprenant au moins 5 10 acides aminés successifs et, de préférence, au moins 15 acides aminés successifs du domaine HLH de TAL-1 de séquence :

QQNVNGAFAELRKLIPTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA

10 correspondant à la SEQ ID No. 1 dans le listage de séquences en annexe ou une séquence équivalente.

15 2) Molécule peptidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée par ou qu'elle comprend une séquence choisie parmi les séquences suivantes :

- QQNVNGAFAELRKLIPTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 1 dans la liste de séquences en annexe),
 - VRRIFTNSRERWRQQNVNGAFAELRKLI (SEQ ID No. 2 dans la liste de séquences en annexe) et
 - PTHPPDKKLSKNEILRLAMKYINFLA (SEQ ID No. 3 dans la liste de séquences en annexe)
- ou une séquence équivalente auxdites séquences.

25 3) Molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est associée à un vecteur.

30 4) Molécule peptidique selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit vecteur est choisi, parmi le groupe comprenant :

- un peptide linéaire dérivé de protégrines ou de tachyplésines,
- un peptide linéaire comprenant un domaine de transduction tels que les domaines de transduction de la

protéine Tat de HIV-1 et les domaines de transduction dérivés de la troisième hélice d'Antennapedia,

- des particules comme les liposomes,
- des polymères tels que le polyéthylène glycol (PEG).

5) Molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que ledit vecteur est un peptide linéaire dérivé de Protégrines, répondant à la formule (I) suivante :

BX(X ou B)BXXXXBBBXXXXXXB (I)

ou un peptide linéaire dérivé de Tachyplésines, répondant à la formule (II) suivante :

15 (B ou X)XXXBXXXBXXXXBBXB (II),

dans lesquelles :

- les groupes B, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé dont la chaîne latérale porte un groupement basique, et

20 - les groupes X, identiques ou différents, représentent un résidu d'acide aminé aliphatique ou aromatique

ou un fragment de ceux-ci constitué d'une séquence d'au moins 5 et de préférence d'au moins 7 acides aminés successifs des peptides de formules (I) ou (II).

25 6) Molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisée en ce que la liaison entre ladite molécule et ledit vecteur est choisie parmi une liaison covalente, une liaison hydrophobe, une liaison ionique, une liaison clivable ou une liaison non clivable dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur des cellules.

7) Molécule peptidique selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite liaison peut être directe ou indirecte par l'intermédiaire d'un bras de liaison (linker) et effectuée au moyen d'un groupe fonctionnel naturellement présent ou introduit soit sur le vecteur, soit sur l'inhibiteur, soit sur les deux.

10 8) Molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les deux composés suivants :

- composé 4 :



- composé 5 :



15 9) Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins une molécule peptidique selon l'une quelconque des revendications précédentes, avantageusement associée dans ladite composition à un véhicule acceptable.

20 10) Composition pharmaceutique selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme appropriée pour une administration par voie parentérale, par voie orale, par voie rectale, par voie nasale, par voie transdermique, par voie pulmonaire ou par voie centrale.

30 11) Utilisation d'un composé capable d'inhiber l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, au traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

12) Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit composé est un inhibiteur compétitif du domaine HLH de TAL-1.

5 13) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce que ledit composé est une molécule peptidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10 14) Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit composé est un composé capable d'inhiber la fixation de TAL-1 sur son partenaire E47.

15 15) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 ou 14, caractérisée en ce que ledit composé est un anticorps reconnaissant soit un épitope au niveau du domaine HLH de TAL-1, soit un épitope au niveau du domaine HLH de E47.

20 16) Procédé pour identifier un composé biologiquement actif susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète consistant à détecter l'inhibition de l'interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47 en présence dudit composé.

25 17) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit procédé comprend les étapes suivantes :

30 (a) mettre en contact la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH) et le composé biologiquement actif à tester,

(b) immunoprecipiter soit la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), soit le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH),

5 (c) si, à l'étape (b), la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) est immunoprecipitée, détecter dans l'immunoprecipitat obtenu à l'étape (b), la présence du facteur de transcription E47 (ou d'un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH),

10 (d) si, à l'étape (b), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH) est immunoprecipité, détecter dans l'immunoprecipitat obtenu à l'étape (b), la présence de la protéine TAL-1 (ou d'un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH),

15 dans le cas où le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine HLH n'est pas présent à l'étape (c) ou si la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH) n'est pas présente à l'étape (d), ledit composé est un agent susceptible d'être utilisé dans la prévention et/ou le traitement des maladies liées à l'angiogenèse et, de préférence, le traitement des cancers, de l'artériosclérose et du diabète.

25 18) Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que, ledit procédé comprend les étapes suivantes :

30 (a') mettre en contact la protéine TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le domaine HLH), le facteur de transcription E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1) et le composé biologiquement actif à tester,

(b') faire migrer sur un gel de polyacrylamide non dénaturant le mélange obtenu à l'étape (a'),

35 (c') visualiser l'absence ou la présence du complexe TAL-1 (ou un fragment de cette protéine comprenant le

domaine HLH) et E47 (ou un fragment de ce facteur comprenant le domaine qui interagit avec TAL-1).

Figure 1

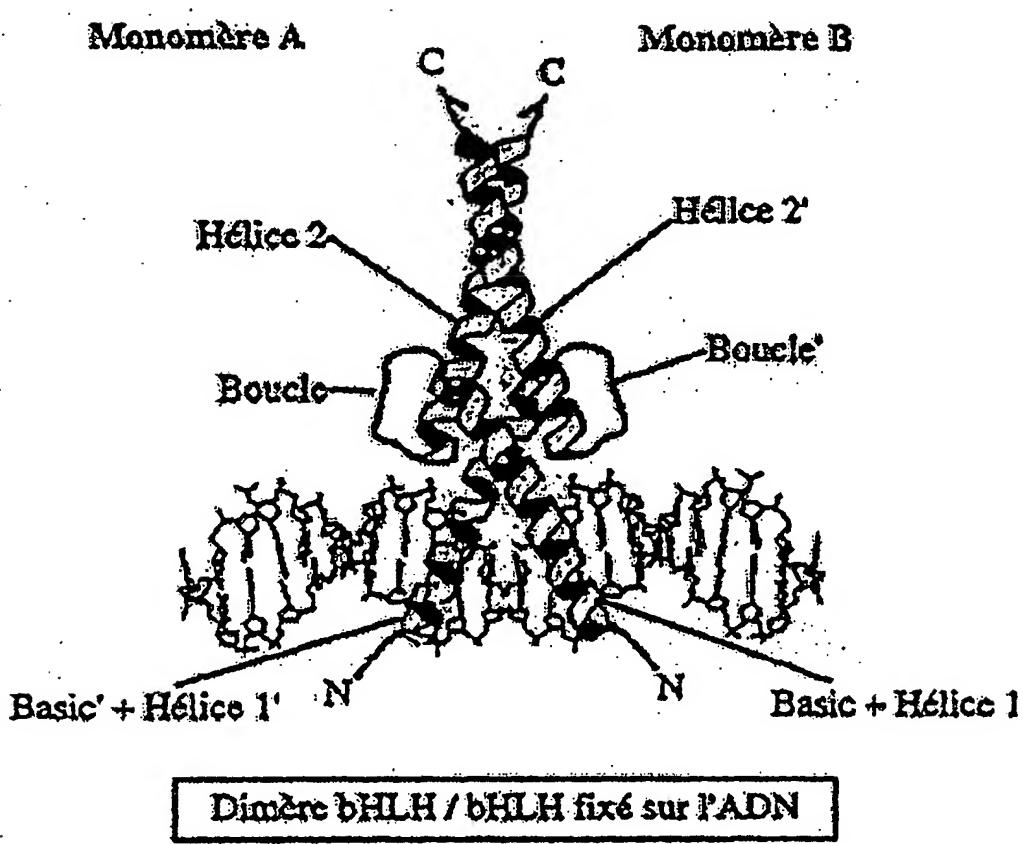


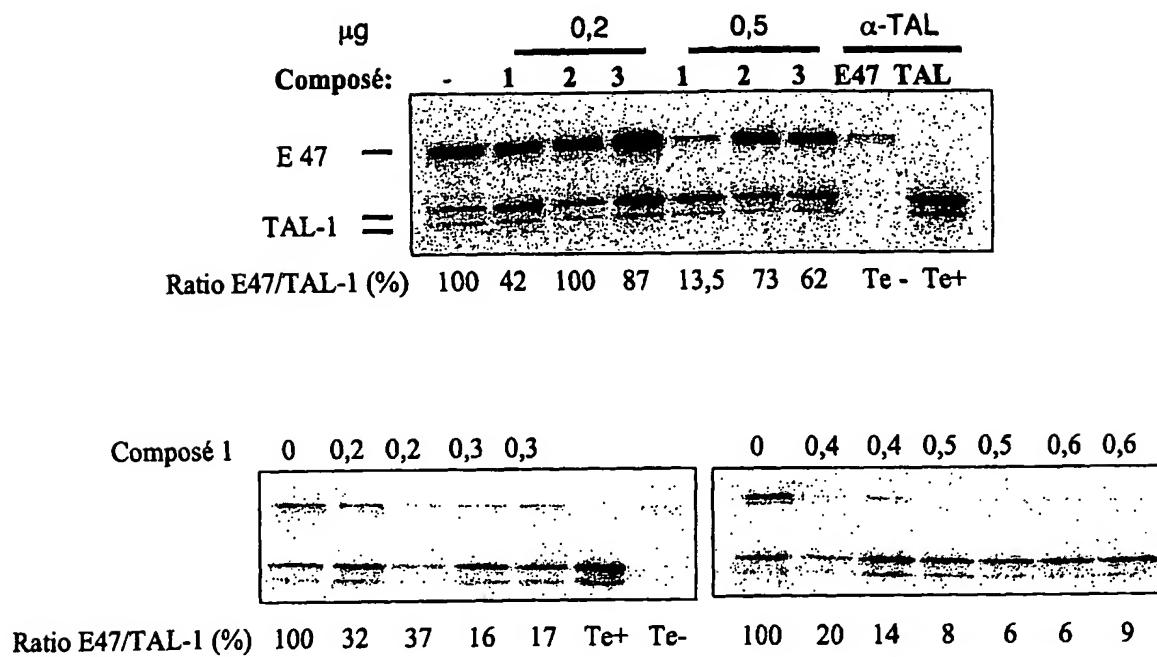
Figure 2

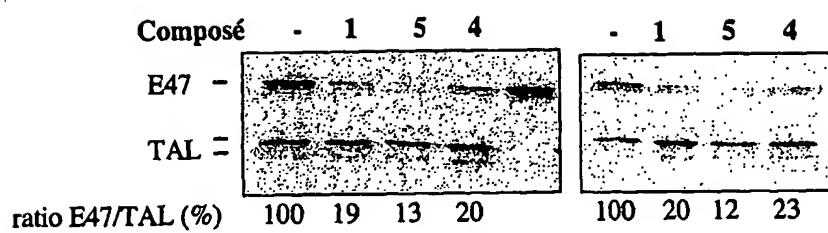
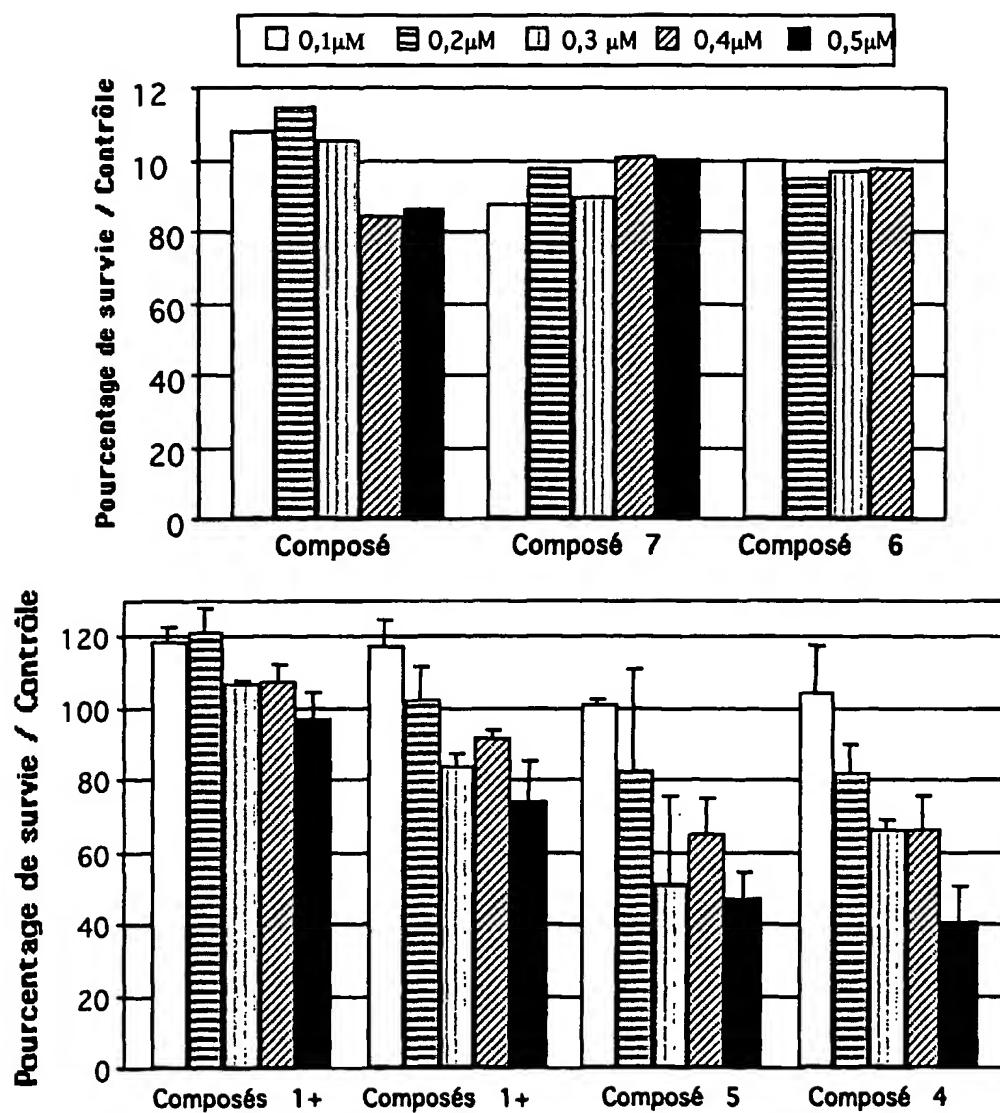
Figure 3

Figure 4



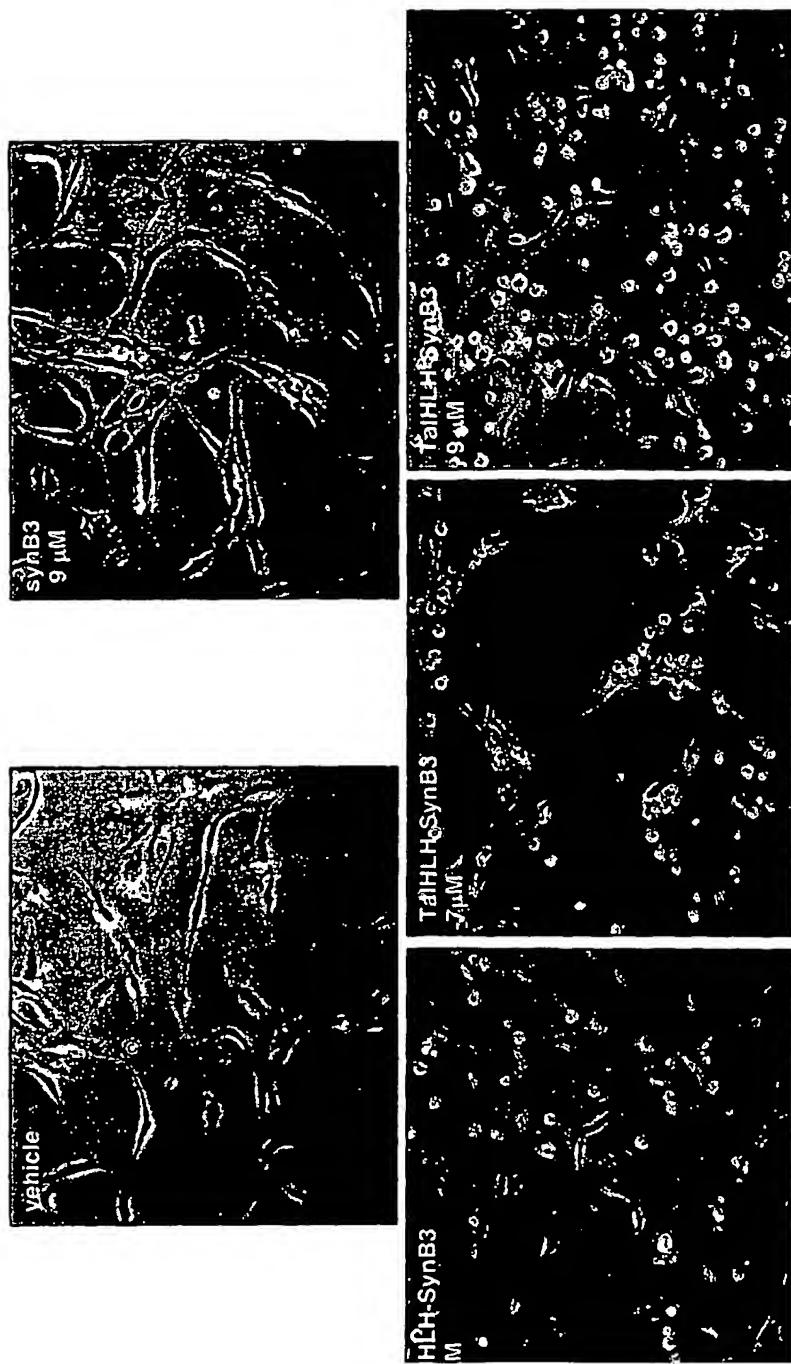


Figure 5

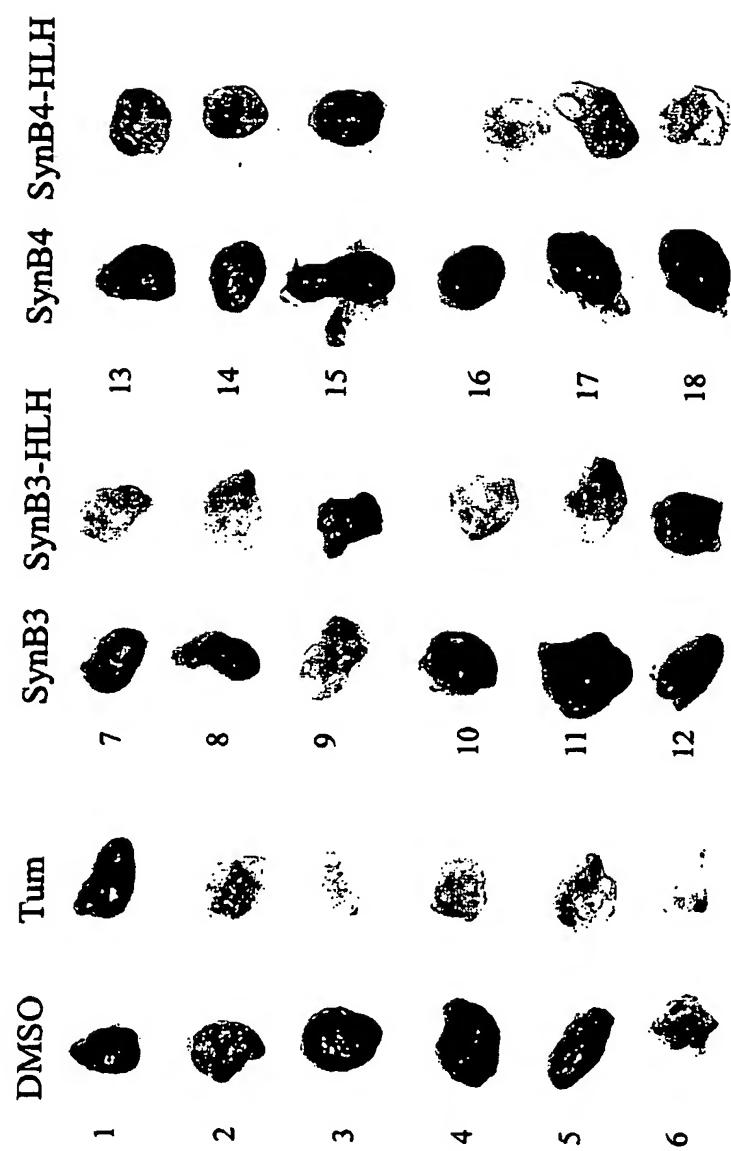


Figure 6

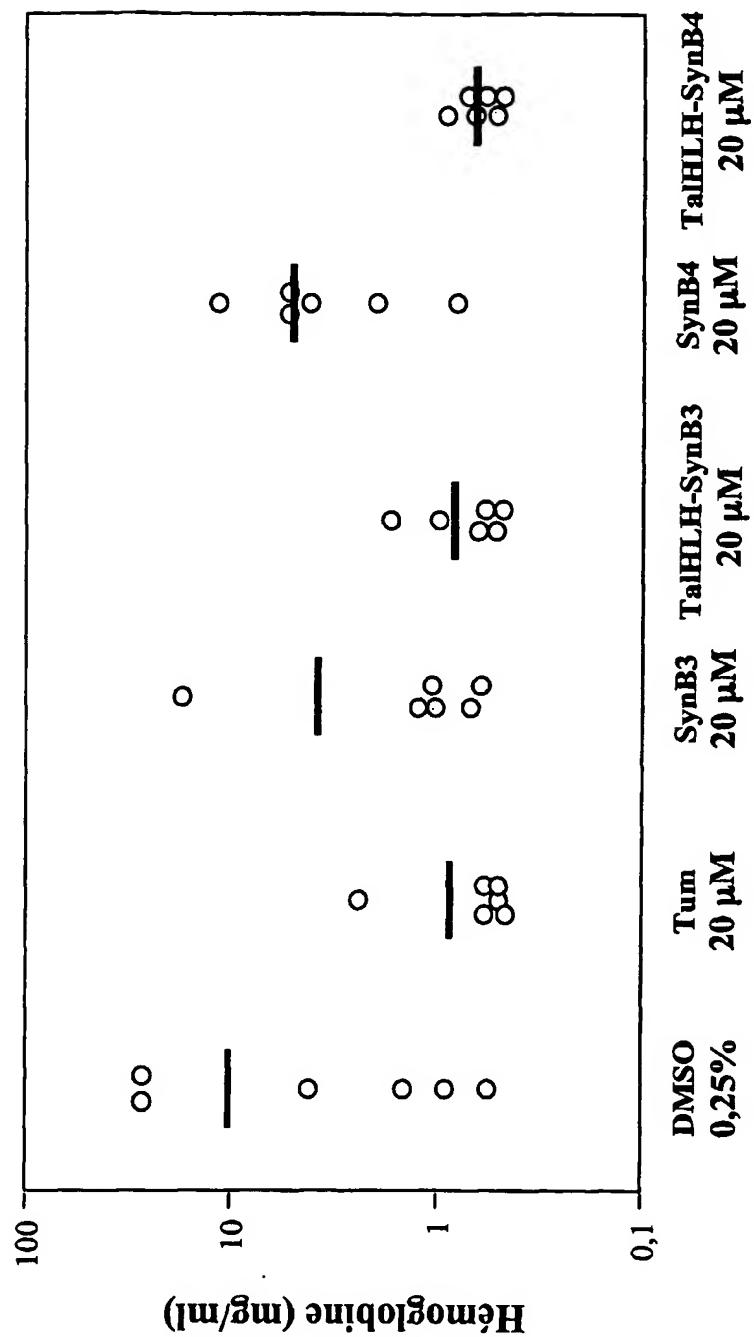


Figure 7

WO 2005/075509

PCT/FR2005/000222

1/3
SEQUENCE LISTING

IAP5 Rec'd PCT/PTO 28 JUL 2006

<110> SYNT:EM

<120> Inhibiteurs de l'angiogenèse, compositions les contenant et leur utilisation pour le traitement des maladies liées à une dérégulation de l'angiogenèse

<130> 35713/PCT

<140> PCT/FR05/XXXXX

<141> 2005-02-02

<150> FR04/05954

<151> 2004-06-02

<150> FR04/00964

<151> 2004-02-02

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(41)

<223> Domaine HLH de TAL-1 (hélice 1-boucle-hélice-2)

<400> 1

Gln	Gln	Asn	Val	Asn	Gly	Ala	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	Lys	Leu	Ile	Pro
1					5				10					15	

Thr	His	Pro	Pro	Asp	Lys	Lys	Leu	Ser	Lys	Asn	Glu	Ile	Leu	Arg	Leu
									25				30		

Ala	Met	Lys	Tyr	Ile	Asn	Phe	Leu	Ala
								35
								40

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(28)

<223> Domaine composé de la région basique et de l'hélice 1 du domaine HLH de TAL-1

<400> 2

Val Arg Arg Ile Phe Thr Asn Ser Arg Glu Arg Trp Arg Gln Gln Asn
1 5 10 15

Val Asn Gly Ala Phe Ala Glu Leu Arg Lys Leu Ile
20 25

<210> 3
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(26)
<223> Domaine composé de la boucle et de l'hélice 2 du domaine HLH de T
AL-1

<400> 3

Pro Thr His Pro Pro Asp Lys Lys Leu Ser Lys Asn Glu Ile Leu Arg
1 5 10 15

Leu Ala Met Lys Tyr Ile Asn Phe Leu Ala
20 25

<210> 4
<400> 4
000

<210> 5
<400> 5
000

<210> 6
<212> PRT
<213> unidentified

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> SynB4

<400> 6

Ala Trp Ser Phe Arg Val Ser Tyr Arg Gly Ile Ser Tyr Arg Arg Ser
1 5 10 15

Arg

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> SynB3

<400> 7

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe
1 5 10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°
PCT/FR2005/000222

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
C1B 7 C07K14/47 G01N33/50 C12N15/62

Seuls la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C1B 7 C07K G01N C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, INSPEC, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GOLDFARB A N ET AL: "Identification of a highly conserved module in E proteins required for <i>in vivo</i> helix-loop-helix dimerization" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 30 JAN 1998 UNITED STATES, vol. 273, no. 5, 30 Janvier 1998 (1998-01-30), pages 2866-2873, XP002330408 ISSN: 0021-9258 figures 1,6 ----- -/-	1,2

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant poser un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

8 document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/06/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/000222

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	No. des revendications vides
X	<p>GOLDFARB A N ET AL: "Nuclear redirection of a cytoplasmic helix-loop-helix protein via heterodimerization with a nuclear localizing partner." EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 214 (2) 481-5. JOURNAL CODE: 0373226. ISSN: 0014-4827., octobre 1994 (1994-10), XP002289011 le document en entier</p>	1,2
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 novembre 2001 (2001-11-16), LAZRAK MONIA ET AL: "Upregulation of the basic helix-loop-helix TAL-1 transcription factor in endothelial cells: A switch from quiescent to angiogenic phenotype?" XP002312562 Database accession no. PREV200200129555 & BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 novembre 2001 (2001-11-16), page 30a, 43RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PART 1; ORLANDO, FLORIDA, USA; DECEMBER 07-11, 2001 ISSN: 0006-4971</p>	
A	<p>WO 00/09657 A (LEE MU EN ; HARVARD COLLEGE (US); MAEMURA KOJI (US); HIESH CHUNG MING) 24 février 2000 (2000-02-24) pages 29-36; revendications 1-56</p>	
A	<p>WO 02/02595 A (SYNT EM S A ; DRIN GUILLAUME (FR); GOMAR JEROME (FR); REES ANTHONY R () 10 janvier 2002 (2002-01-10) le document en entier</p>	
A	<p>DAY FIONA H ET AL: "Induction of antigen-specific CTL responses using antigens conjugated to short peptide vectors." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950), (2003 FEB 1) 170 (3) 1498-503. JOURNAL CODE: 2985117R. ISSN: 0022-1767., 1 février 2003 (2003-02-01), XP002259153 le document en entier</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000222

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0009657	A 24-02-2000	AU 5562999 A WO 0010096 A1 WO 0009657 A2 US 2003032609 A1 US 6395548 B1	06-03-2000 24-02-2000 24-02-2000 13-02-2003 28-05-2002
WO 0202595	A 10-01-2002	FR 2810985 A1 AU 7261501 A CA 2414355 A1 EP 1297001 A1 WO 0202595 A1 JP 2004517039 T US 2003186890 A1	04-01-2002 14-01-2002 10-01-2002 02-04-2003 10-01-2002 10-06-2004 02-10-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/000222

Cadre II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. Les revendications n°^s 11, 12, 14 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210

3. Les revendications n°^s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^s.
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^s.

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/SA/ 210

Suite du cadre II.2

Revendications nos. : 11,12,14

Les revendications 11,12 et 14 présentes réfèrent à un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir un "composé capable d' inhiber (inhibiteur compétitif) l' interaction entre le domaine HLH de TAL-1 et son partenaire E47, en particulier un composé capable d' inhiber la fixation de TAL-1 sur son par aire E47.

Le revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou porpriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l' Article 6 PCT et/ou un exposé aus sens de l ' Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d' exposé à un point tel qu' une recherche significative était impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les renvedications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu' une recherche significative était impossible.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche.Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.5) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.